

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIA TEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Ustina Põnova

**Tsirkuleeriva rakuvaba DNA kasutamine vähi biomarkerina**

Bakalaureusetöö

Juhendaja Tarmo Annilo, PhD

TARTU 2015

# Sisukord

Sisukord.....	2
Kasutatud lühendid.....	4
Sissejuhatus.....	5
1. Kirjanduse ülevaade.....	6
1.1.Rakuvaba DNA bioloogiline taust ja tähendus.....	6
1.2.Vereplasmas tsirkuleeriva rakuvaba DNA päritolu.....	7
1.2.1. Apoptoos.....	8
1.2.2. Nekroos.....	9
1.2.3. Rakuvaba DNA tervetest rakkudest.....	10
1.2.4. Teised tsirkuleeriva rakuvaba DNA allikad.....	10
1.3.Tsirkuleeriva rakuvaba DNA tuvastamine ja analüüsi meetodid.....	11
1.3.1. Denatureeriv kapillaarelektroforees ( <i>DCE</i> ).....	12
1.3.2. Mutatsioonide suhtes rikastatud PCR ( <i>ME-PCR</i> ) ja COLD-PCR.....	13
1.3.3. BEAMing.....	13
1.3.4. Digitaalne PCR.....	14
1.3.5. Ühe molekuli sekveneerimine.....	14
1.3.6. Suunatud süvasekveneerimine .....	14
1.4.Tsirkuleeriva rakuvaba DNA kasutamine vähi biomarkerina.....	15
1.4.1. cfDNA kasutamine vähkkasvaja diagnoosimisel ning molekulaarsel iseloomustamisel.....	16
1.4.2. cfDNA kasutamine prognoosimisel.....	17
2. Eksperimentaalne osa.....	20
2.1.Töö eesmärgid.....	20
2.2.Materjal ja metoodika.....	20
2.2.1. Tsirkuleeriva rakuvaba DNA eraldamine.....	20
2.2.2. Eraldatud DNA ja standardlahuste kontsentratsioonide kontroll.....	21
2.2.3. Kvantitatiivne reaal-aja PCR (qPCR).....	21
2.2.4. qPCR'i andmete analüüs.....	23
2.3. Tulemused ja arutelu.....	25

Kokkuvõte.....	29
Summary.....	30
Kasutatud kirjandus.....	32
Kasutatud veebilehed.....	41
Tänuavaldused.....	42
Lihtlitsents.....	43

## Kasutatud lühendid

CAE – *carcinoembryonic antigeen* – kartsinoembrüonaalne antigeen

cfDNA – *circulating cell-free DNA* – tsirkuleeriv rakuvaba DNA

ctDNA – *circulating tumor DNA* – tsirkuleeriv tuumori DNA

gDNA – *genomic DNA* – genoomne DNA

IPC – *internal positive control* – sisemine positiivne kontroll

LOH – *loss of heterozygosity* – heterosügootsuse kadu

ME-PCR – *mutant-enriched PCR* – mutatsioonide suhtes rikastatud PCR

mtDNA – *mitochondrial DNA* – mitokondriaalne DNA

PARE – *personalized analysis of rearranged ends* – ümberkorraldatud fragmentide personaalne analüüs.

## Sissejuhatus

Vähk on üheks peamiseks surma põhjustajaks maailmas. 2012. aastal registreeriti maailmas 8,2 miljonit vähist põhjustatud surmajuhtumit (veebilehekülg: *International Agency for Research on Cancer*, 2015). See moodustab 22% kõikidest maailmas fikseeritud surmajuhtumitest, mis olid põhjustatud mitteinfektsiooniliste haiguste poolt. Igal aastal diagnoositakse maailmas 14,1 miljonit vähijuhtumit (veebilehekülg: *World Health Organisation*, 2015)

Üheks oluliseks vähijuhtude vähendamise võimaluseks on kasvaja varajane diagnoosimine. Tulenevalt sellest, et vähi varane avastamine osutub paljudel juhtudel keerukaks, on efektiivse ravi määramine ja haiguse arengu ennustamine samuti raskendatud.

Mitteinvasiivse vähidiagnostika valdkonnas on tehtud palju uuringuid, kuid ennetavate vähi biomarkerite laialdase rakendamiseni meditsiinis pole veel jõutud.

Üks perspektiivikamaid vähi biomarkereid on tsirkuleeriv rakuvaba DNA (cfDNA), mida leidub inimese vereplasmas (Dawson *et al.*, 2013). Rakuvaba DNA võib olla lagunenud nii lühikesteks (70 – 200 aluspaari), kui ka pikemateks fragmentideks (kuni 21 000 aluspaari) (González-Masiá *et al.*, 2013).

Esmakordselt eraldati DNA tervete doonorite vereplasmast 1948. aastal (Schwarzenbach *et al.*, 2011). Vereringes olev DNA on tugevalt fragmenteerunud ning madala kontsentratsiooniga. cfDNA saagikus sõltub peamiselt eraldamisel kasutatud tehnoloogiast, reagentidest, meetodika spetsiifilisusest ja tundlikkusest ning vereproovide kvaliteedist ja hulgast (Schwarzenbach *et al.*, 2011). cfDNA saagikus on erinevate meetodite puhul väga varieeruv.

cfDNA analüüsi kasutamine võiks aidata lahendada probleeme laboratoorse meditsiini põhisuundades - skriiningus, diagnostikas, prognoosimisel ja monitooringus. Spetsiifiliste kasvajamarkerite (näiteks vähispetsiifilised mutatsioonid) tuvastamine cfDNAs võiks olla abiks diagnoosi täpsustamisel. cfDNA sisalduse ja apoptootilise indeksi hinnang aitab nii haiguse arengu kui ka ravi efektiivsuse prognoosimisel. (Zaitsev ja Skvorcov, 2009)

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1. Rakuvaba DNA bioloogiline taust ja tähendus

Rakuvaba DNA määramist vereplasmast on hakatud nimetama vedelaks biopsiaks, kuna see aitab vältida biopsiaproovi võtmist kasvajakoe (Schwarzenbach *et al.*, 2011). Korduv vereproovi võtmine lubab jälgida rakuvaba DNA muutusi haiguse käigus (Schwarzenbach *et al.*, 2011). Tsirkuleeriva rakuvaba DNA analüüsi abil on võimalik tuvastada geneetilisi ja epigeneetilisi muutusi, mis on seotud vähkkasvaja arenguga (Schwarzenbach *et al.*, 2011).

Pahaloomuline kasvaja koosneb tavaliselt erinevatest vähirakkude kloonidest, millest tuleneb kasvaja geneetiline ja epigeneetiline heterogeensus, ja teistest rakutüüpidest nagu näiteks vereloomerakud ja stroomarakud (Schwarzenbach *et al.*, 2011). Seega kasvaja arenemise käigus vabaneb verre DNA nii kasvaja- kui ka normaalsetest rakkudest (Schwarzenbach *et al.*, 2011). Näiteks tsirkuleeriva tuumori DNA (ctDNA) osakaal, mis verre satub, sõltub kasvaja seisundist ja suuruselt (Schwarzenbach *et al.*, 2011). Samuti mõjutavad ctDNA hulka vereringes füsioloogilised tegurid, mis on seotud vere ja lümfi filtreerimisega (Schwarzenbach *et al.*, 2011). Vähihaigetel esineb cfDNA hulgas genoomne DNA ning ka mitokondriaalne ja viiruslik DNA (Schwarzenbach *et al.*, 2011).

Tsirkuleeriv tuumori DNA esineb peamiselt mononukleosoomina või oligonukleosoomina, lisaks võib see olla seotud vererakkude pinna valkudega, millel on spetsiifilised nukleiinhappeid siduvad omadused (Laktionov *et al.*, 2004). Nukleosoom koosneb histoonide oktameerist, mille ümber keerdub 1,65 korda 145 - 147 aluspaari pikkune DNA ahel (Luger *et al.*, 1997). Füsioloogilistes tingimustes on need kompleksid pakitud apoptootilistesse osakestesse (Stollar ja Stephenson, 2002). Apoptootilise rakusurma juhtumite suure hulga korral, mis võib olla põhjustatud kiiresti areneva kasvaja või kemoteeraapiat poolt, võib veres nukleosoomide hulk suureneda (Ward *et al.*, 2008). Ringlevate nukleosoomide avastamine näitas, et cfDNA vabastamise käigus säilitab DNA mõned tuumakromatiini omadused (Schwarzenbach *et al.*, 2011).

Mõnede kasvajatüüpide korral esineb cfDNA hulgas ka viiruslik DNA. Spetsiifiline viiruslik DNA võib olla potentsiaalseks molekulaarseks vähi biomarkeriks. Sellised viirused nagu inimese papilloomiviirus, B-hepatiidi viirus ja Epstein-Barr'i viirus võivad olla mõnede vähkide tekkepõhjuseks (Dennis Lo *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2008). Viirusliku DNA kasutamise piiranguks on see, et üks ja sama viirus võib põhjustada nii

healoomulist kui ka halvaloomulist viirusinfektsiooni. Selline olukord võib raskendada analüüsi tulemuste tõlgendamist, eriti juhul kui tegemist on diagnostilise uuringuga.

cfDNA võib sisaldada nii kodeerivat kui ka mittekodeerivat genoomset DNAd (gDNA), mida saab kasutada mutatsioonide, polümorfismide, metülatsiooni, mikrosatelliitide ebastabiilsuse ja heterosügootsuse kao uurimiseks (Schwarzenbach *et al.*, 2011).

Üheks kõige suuremaks puuduseks cfDNA analüüsimisel on mõnede mutatsioonide väga madal esinemissagedus, mille tõttu normaalse (*wild-type*) cfDNA fragmendid häirivad mutatsioonide analüüsimist (Schwarzenbach *et al.*, 2011).

cfDNA metüleerimismustrite analüüs on paljutõotav meetod riskianalüüsi korral. Näiteks on promootori hüpermetülatsiooni määramine võrreldes mikrosatelliitide analüüsiga palju tundlikum meetod (Schwarzenbach *et al.*, 2011).

## **1.2.Vereplasmas tsirkuleeriva rakuvaba DNA päritolu**

Vereplasmas tsirkuleeriva rakuvaba DNA päritolu on uuritud juba rohkem kui 30 aastat. Vähihaigetel on DNA hulk vereplasmas sageli tõusnud. Samas on teada, et ainult osa kogu tsirkuleerivast rakuvabast DNAST pärineb vähikudedest ning selle hulka on võimalik hinnata kasvajaspetsiifiliste markerite abil (Jahr *et al.*, 2001). Vähi DNA kogus vereplasmas võib tugevasti varieeruda ka ühe vähitüübi piires, moodustades 3 – 93% kogu ringlevast DNAST (Jahr *et al.*, 2001).

On teada, et *CDKN2A* geeni promootor on hüpermetülatsiooni tõttu inaktiveeritud peaaegu kõikides vähitüüpides. Kontrollides *CDKN2A* geeni promootori metülatsioonitaset, on võimalik määrata vähi DNA osa kogu vereplasmas ringlevast DNAST. Analüüsides neljateistkümne erineva vähitüübi metülatsioonitaset 30 patsiendi proovis, suudeti edukalt määrata *CDKN2A* geeni promootori hüpermetülatsioon üheteistkümnel patsiendil järgmiste vähitüüpide korral: rinnavähk, angiosarkoom, pea- ja kaelavähk, Ewing'si sarkoom, melanoom, kõhunäärmevähk, kolorektaalvähk, söögitoruvähk ja mitteväikerakk-kopsuvähk (Jahr *et al.*, 2001). Paljud DNA proovid sisaldasid nii metüleeritud vähi DNAd kui ka mittemetüleeritud DNA järjestusi, kuid nende osakaal varieerus erinevate proovide vahel tugevalt. Uuringus analüüsiti üheksat rinnavähi proovi. *CDKN2A* geeni promootori kõrget metülatsioonitaset näitasid neist vaid viis proovi. Kõige kõrgema metülatsioonitasemega proovis oli 90% metüleeritud vähi DNAd ning kõige madalama metülatsioonitasemega proovis oli vähi DNA sisaldus alla 10% (Jahr *et al.*, 2001). *CDKN2A* geeni promootori

metülatsioonitaseme ja ringleva DNA koguse vahel pole fikseeritud otsest sõltuvust (Jahr *et al.*, 2001). Iga vähitüübi korral võib geenide promootoralade hüpermetülatsiooni määramiseks kasutada erinevaid biomarkereid. Ülaltoodud uuringus tuvastati *CDKN2A* geeni promootorala metülatsioonitaseme analüüsiga vähi DNAd 37% vähipatsientidel. Kasutades lisaks vähitüübispetsiifilist biomarkerit, on vähi DNA suhtes võimalik saavutada kõrgemat spetsiifilisust, näiteks rinnavähi DNA hüpermetülatsiooni tuvastamiseks kasutati uuringus geenide *ATM*, *CHFR* ja *VHL* promootoralasid (Murria *et al.*, 2015). Antud geenide promootoralad olid hüpermetüleeritud 40 – 50% vähijuhtumites (Murria *et al.*, 2015).

Kõikides vähirakkudes on DNA reeglina muteerunud (Diehl, 2005). Vereplasmas on muteerunud ainult osa ringlevatest DNA fragmentidest. See näitab, et paljudel vähipatsientidel ei ole suurem osa tsirkuleerivast rakuvabast DNAST pärit kasvajakarudest (Diehl, 2005). Hilistel kasvaja staadiumitel on keskmine vähi DNA osa kogu ringlevas DNAs 11% (1,9 – 27%) (Diehl, 2005). Vähi algstaadiumis on vähikoest pärit DNAd vereringes vähem, ainult umbes 1% (0,03 – 1,75%) (Diehl, 2005).

Uuringutest võib järeldada, et vähi DNA sattub vereringesse nekrootiliste protsesside tagajärjel. Normaalsest rakkudest eraldub DNA aga apoptoosi ja muude protsesside käigus (Diehl, 2005; Jahr *et al.*, 2001).

### **1.2.1. Apoptoos**

Apoptoos on ensümaatilise kontrolli all olev programmeeritud rakusurm (Farber, 1994). Apoptoosi käigus tõmbuvad rakud kokku, tuuma sisemus kondenseerub, DNA fragmenteerub ning kogu rakk jaguneb väikesteks apoptootilisteks kehadeks, mis hiljem lüüsitakse (Proskuryakov ja Gabai, 2010).

Apoptoos esineb nii tervetel kui ka haigetel ja kahjustatud rakkudel (Farber, 1994). Apoptoosi võivad esile kutsuda kaht tüüpi signaalid: rakusisese stressi signaalid ja rakuvälised ligandid (de Bruin ja Medema, 2008). Rakusisese stressi signaalideks võivad olla DNA kahjustused, oksüdatiivne stress või onkogeeni aktivatsioon (de Bruin ja Medema, 2008). Stressi tingimustes on apoptoos vähkkasvaja arengu peamine takistus (Hanahan *et al.*, 2000).

Apoptoosi algasel etapil lõigatakse kromosomaalne DNA suurteks fragmentideks (50 - 300 kb) (Nagata, 2005). Hiljem pakitakse DNA fragmendid 180 - 200 bp pikkuste fragmentidena nukleosoomidesse (Nagata, 2005).

Apoptoosi peetakse üheks ringleva rakuvaba DNA allikaks, kuna paljud ringleva DNA fragmendid on 180 - 200 bp pikkused (van der Vaart ja Pretorius, 2008). On teada, et rakud,



mis läbivad apoptoosi, lagundatakse fagotsüütide poolt ning DNA lagundatakse lüsoosoomides ensüümi Dnase II poolt (Nagata, 2005; Viorritto *et al.*, 2007). Nende andmete põhjal peavad DNA fragmendid olema lagundatud kujul juba enne kui need satuvad vereringesse (Jahr *et al.*, 2001). Ainus võimalus, et apoptootilise raku DNA satub vereringesse, on juhul, kui rakkude suremus on liiga kõrge ja apoptootilisi kehakesi on vähe või nad on kahjustunud (Nagata, 2005).

### **1.2.2. Nekroos**

Nekroos on mittekontrollitav rakusurm. Nekroosi kutsuvad esile füüsilised või keemilised kahjustused. Erinevalt apoptoosist on nekroos sageli juhuslik ja ensüümide poolt mittekontrollitav (Farber, 1994). Nekroosi käigus rakk paisub, raku membraan puruneb ning kogu raku sisemus lüüsitakse kiiresti (Proskuryakov ja Gabai, 2010).

Makrofaagidel on otsene mõju DNA eraldumisele nekrootilistest rakkudest. Nekrootilised rakud ise eraldavad DNAd väga väikestes kogustes, kuid koos makrofaagidega suureneb rakuvälise DNA kogus mitu korda (Choi *et al.*, 2005). Makrofaagide ja nekrootiliste rakkude segust eraldatud rakuväline DNA on võrreldes normaalse kromosomaalse DNAGA madalama molekulaarse massiga (Choi *et al.*, 2005).

Kasvaja suurenemisel tõuseb ka vereringes esineva rakuvaba DNA kogus nekrootilistest rakkudest (Diehl, 2005). Kasvaja suurenemine põhjustab kasvajakudedes hapnikuvaegust, mis omakorda põhjustab nii vähirakkude kui ka kasvajat ümbritsevate kudede nekroosi (Diehl, 2005). See põhjustab nii tsirkuleeriva rakuvaba vähi DNA kui ka normaalsetest rakkudest pärineva DNA koguse tõusu vereringes (Diehl, 2005).

### **1.2.3. Rakuvaba DNA tervetest rakkudest**

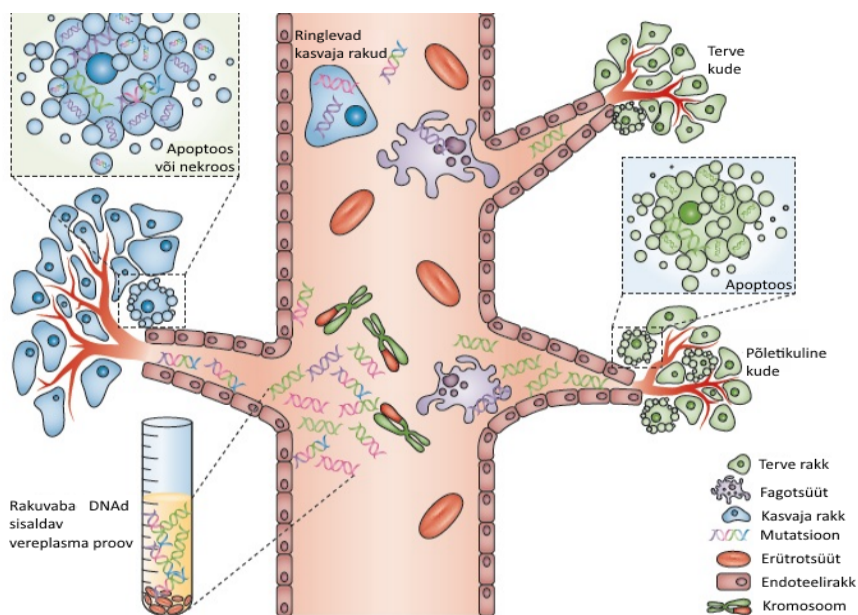
1975. aastal avastati, et lümfotsüüdid eraldavad väliskeskkonda kaksikahelalist DNAd, seni kuni teatud rakuvaba DNA kontsentratsioon on saavutatud (Anker *et al.*, 1975). DNA sekreteerimist lümfotsüütide ja teiste rakkude poolt on tõestatud ka hilisemates uuringutes (Chen *et al.*, 2005). Nii vähirakud, kui ka teised rakutüübid on võimelised rakuvälist DNAd sekreteerima (Chen *et al.*, 2005). On näidatud, et rakuvaba DNA esineb keskkonnas isegi juhul kui rakukultuuris ei ole surnud või surevaid rakke (Chen *et al.*, 2005). Samasugust olukorda on näidatud ka vähi varases staadiumis, kus rakkude suremus on üsna väike, aga tsirkuleeriva rakuvaba DNA kogus on juba märgatavalt tõusnud (Chen *et al.*, 2005).

#### 1.2.4. Teised tsirkuleeriva rakuvaba DNA allikad.

Viirusliku päritoluga kasvajate puhul leidub viiruse DNAd ka vereplasmas. Näiteks Epstein-Barr viiruse DNA tuvastati 96% kaelavähi patsientide vereplasmast (Dennis Lo *et al.*, 1999) ja inimese papilloomviiruse (HPV-16) DNAd leiti 50% emakakaelavähi patsientide vereproovidest (Yang *et al.*, 2004).

Peale genoomse DNA leidub vereplasmas ka mitokondriaalset DNAd (mtDNA). 90% vähirakkude mtDNast sisaldab vähemalt ühte kasvajaspetsiifilist mutatsiooni (He *et al.*, 2010). Suurem osa mitokondriaalse DNA mutatsioone on heteroplasmilised ehk esinevad vaid teatavas hulgas mtDNA molekulitest (He *et al.*, 2010).

On oletatud, et osa rakuvabast DNAST võib pärineda rakkudest, mis on kaotanud rakutuuma, aga jäänud siiski eluvõimeliseks (Bischoff, 2004).



**Joonis 1:** Tsirkuleeriva rakuvaba DNA päritolu. Kohandatud Crowley *et al.*, 2013 järgi.

### 1.3. Tsirkuleeriva rakuvaba DNA tuvastamine ja analüüsi meetodid

Üha rohkem uuritakse võimalusi, kuidas kasutada veres ringlevaid nukleiinhappeid kasvajate varajaseks avastamiseks ja jälgimiseks. DNA tuvastamise protsess algab proovide korjamisest ja töötlemisest ning plasma isoleerimisest (Benesova *et al.*, 2013). Järgmine oluline etapp on rakuvaba DNA plasmast isoleerimine, tuvastamine ja kvantiseerimine (Benesova *et al.*, 2013). Selleks, et eristada kasvaja DNAd kogu veres tsirkuleerivast rakuvälisest DNAST, tuleb kasutada molekulaarseid meetodeid, mis põhinevad normaalse ja tuumori DNA erinevustel (Bidard *et al.*, 2013). Näiteks on võimalik isoleeritud cfDNAs määrata tuumorile iseloomulikke spetsiifilisi somaatilisi mutatsioone (Benesova *et al.*, 2013). Reeglina on kasvaja DNA osakaal väike ning selleks, et mutatsioone detekteerida, tuleb kasutada tundlikke meetodid nagu näiteks reaalaaja polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR), "BEAMing" või denatureeriv kapillaarelektroforees (Benesova *et al.*, 2013). Samuti kasutatakse mutatsioonide määramiseks mutatsioonide suhtes rikastavat PCR'i (*mutant-enriched* PCR) ja COLD-PCR'i (koamplifitseerimine toimub madala denatureerimise temperatuuri juures) (Benesova *et al.*, 2013). Uuematest meetoditest on paljulubav ühe molekuli sekveneerimine (Benesova *et al.*, 2013).

cfDNA eduka detekteerimise aluseks on sobiva isoleerimismeetodi valik, et oleks võimalik eraldada piisavas koguses DNAd (Benesova *et al.*, 2013). Tavaliselt eraldatakse DNA spetsiaalsete rakuvaba DNA eraldamiseks välja töötatud kommertsiaalsete komplektidega, mis töötavad kolonn-põhimõttel (Benesova *et al.*, 2013).

Ringleva DNA kontsentratsioon plasmas on väga madal, samuti on ctDNA tugevasti fragmenteerunud (Fong *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2008). ctDNA saagikuse hulk on erinevate meetodite puhul väga varieeruv (Fong *et al.*, 2009). Seni puudub kahjuks ühtne standardmetoodika, mille alusel tsirkuleerivat DNAd eraldada ning saadud andmeid analüüsida (Schwarzenbach *et al.*, 2011).

Kaks peamist lähenemist rakuvaba DNA analüüsimiseks on kvantitatiivne analüüs ja DNA-spetsiifilistel mutatsioonidel põhinev analüüs (Benesova *et al.*, 2013). Esimene lähenemine põhineb ainult cfDNA kvantiseerimisel, tegemata vahet DNA päritolul (Boni *et al.*, 2007). Selline cfDNA analüüsimeetod on madala tundlikkusega, kuna amplifitseeritakse nii tuumori kui ka normaalsete rakkude DNAd (Benesova *et al.*, 2013). Kõrgenenud DNA tase vähipatsientide plasmas, võrreldes tervete inimestega, viitab rakuvaba vähi DNA (ctDNA) olemasolule (Benesova *et al.*, 2013). Tegelik ctDNA kogus määratakse mõne spetsiifilise markeri sekveneerimisega (Van der Vaart ja Pretorius, 2010).

Alternatiivne võimalus cfDNA ja sealhulgas ka ctDNA analüüsimiseks põhineb kasvaja-spetsiifiliste mutatsioonide tuvastamisel primaarses tuumoris ning seejärel samade markerite otsimisel tsirkuleerivast DNAs (Benesova *et al.*, 2013). Tavaliselt uuritakse tuumor-spetsiifiliste mutatsioonidena punktmutatsioone, proto-onkogeene ja tuumor-supressor geenide ümberkorraldusi, aga ka suuremaid deletsioone ning DNA metülatiooni taseme muutusi tuumor-supressor geenide promootoralades (Benesova *et al.*, 2013).

Suuremate deletsioonide ülesleidmine on võimalik kasutades heterosügootsuse kao meetodit (*loss of heterozygosity, LOH*) (Benesova *et al.*, 2013).

DNA metülatiooni võib uurida mitmel viisil nagu näiteks kasutades metüül-spetsiifilist PCR'i (Wong *et al.*, 1999), kvantitatiivset või fluorestseeruvat metüül-spetsiifilist PCR'i (Wong, 2004; Frattini *et al.*, 2008) ning metüül-spetsiifilist restriksioonifragmentide analüüsi (Deligezer *et al.*, 2003). Kuigi metülatiooni analüüsil põhineva cfDNA detekteerimise meetodi tundlikkus on suhteliselt kõrge, on selle spetsiifilisus piiratud (Benesova *et al.*, 2013).

#### 1.3.1. Denatureeriv kapillaarelektroforees (*DCE*)

Kapillaarelektroforees on DNA analüüsimisel kasutusel olnud juba aastakümneid (Benesova *et al.*, 2013). *DCE* peamine tööprintsip seisneb osaliselt denatureerunud kaheaahelaliste fragmentide lahutamisel (Benesova *et al.*, 2013). Homodupleksid on ideaalse järjestuse komplementaarsusega fragmendid, heterodupleksites on aga peaaegu kogu järjestus komplementaarne, välja arvatud need positsioonid, kus on toimunud mutatsioon (Benesova *et al.*, 2013). Homo- ja heterodupleksite lahutamine toimub tänu nende erinevale sulamistemperatuurile (Benesova *et al.*, 2013). Kõrgema sulamistemperatuuriga fragmendid (homodupleksid) jäävad denatureerimata kujule (kaheaaheliseks) ning need liiguvad kiiremini võrreldes madala sulamistemperatuuriga fragmentidega, mis on denatureerunud kujul (Bjørheim *et al.*, 2003).

#### 1.3.2. ME-PCR (mutatsioonide suhtes rikastatud PCR) ja COLD-PCR

ME-PCR'i meetod põhineb muteerunud DNA amplifitseerimisel PCR'i reaktsiooni käigus mittemuteerunud DNA (*wild-type*) allasurumisel. Mittemuteerunud DNA eemaldamiseks lisatakse reaktsioonile restriktase, mis lõikavad metsik-tüüpi DNAd.

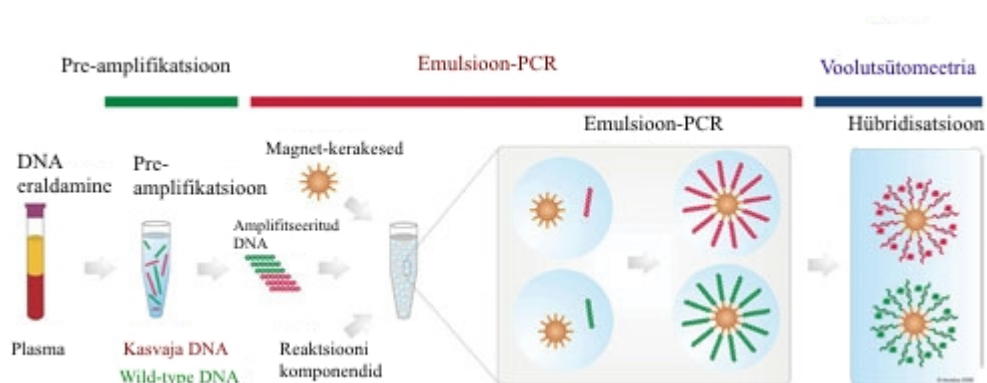
Alternatiivseks meetodiks võib kasutada COLD-PCR'i. Selle meetodi puhul kasutatakse muteerunud DNA fragmentide amplifitseerimiseks suhteliselt madalat temperatuuri (Li *et al.*, 2008). Sellistes tingimustes seonduvad praimerid ainult muteerunud DNAGA, mittemuteerunud DNA jääb aga amplifitseerimata. Reaktsiooni käigus muteerunud fragmentidest moodustuvad kokkusobimatud (*mismatch*) dupleksid. Selle meetodi tulemusena saadakse muteerunud fragmentide suhtes rikastunud plasma. Mõlemad meetodid sobivad hästi DNA analüüsimiseks, sest neid on standardsetes laboritingimustes lihtne kasutada (Mancini *et al.*, 2010; Carotenuto *et al.*, 2012; Zuo *et al.*, 2009).

### 1.3.3. BEAMing

BEAMing on kõrge tundlikkusega meetod, mis põhineb voolu-tsütomeetriaal ja digitaalsel PCR reaktsioonil. BEAMing meetod aitab detekteerida somaatilisi mutatsioone ctDNAs (Diehl ja Smergliene, 2013). PCR'i produktid, mis sisaldavad spetsiifilisi mutatsioone, segatakse kokku "magnet-kerakestega" (*magnetic beads*). Seejärel viiakse läbi teine PCR, kasutades samu praimerid, mis olid seotud "magnet-kerakestega". Sellele järgneb hübridisatsioon, mille käigus PCR'i produktid märgistatakse spetsiifiliste fluorestseeruvate markeritega. Tulemuseks on see, et muteerunud ja mittemuteerunud DNAd fluorestseeruvad erinevalt. Analüüsi lõpus uuritakse DNAd voolu-tsütomeetria abil.

Võrreldes teiste meetoditega näitab BEAMing kõige kõrgemat tundlikkust ning nimetatud meetod võimaldab detekteerida ühe mutantse alleeli 10 000 metsik-tüüpi alleeli hulgast (Diehl, 2005; Diehl *et al.*, 2008; Holdhoff *et al.*, 2011).

BEAMing meetodi kasutamist limiteerivad spetsiifiliste töövahendite vajadus ning selle läbiviimise kulu ja suhteliselt suur töömaht. Samuti vajab meetod personaliseerimist, see tähendab et iga patsiendi jaoks tuleb eelnevalt määrata tema mutatsioonide profiil (Crowley *et al.*, 2013).



**Joonis 2:** BEAMing reaktsioon. Kohandatud Diehl ja Smergeliene, 2013 järgi.

### 1.3.4. Digitaalne PCR

Digitaalse PCR'i tööprintsip seisneb selles, et DNA proov on jagatud mitmeks osaks (alikvoodiks) nii, et igas fraktsioonis oleks ligikaudu üks koopia DNAd. Polümeraasi ahelreaktsioon käivitatakse standardsetes tingimustes kõikides proovides ning igat fraktsiooni analüüsitakse uuritava järjestuse alusel. Tulemus on kas positiivne või negatiivne, kus positiivsed reaktsioonid sisaldavad uuritavat DNAd. Tänu digitaalse PCR'ile võib detekteerida mutatsioone, mis esinevad väga väikese sagedusega (Benesova *et al.*, 2013).

### 1.3.5. Ühe molekuli sekveneerimine

Traditsioonilisel sekveneerimisel amplifitseeritakse DNAd palju kordi ning DNA järjestus loetakse paljundatud koopiatelt. Ühe molekuli sekveneerimise puhul amplifitseerimise etappi ei ole, seega on nimetatud meetodi eeliseks tema lihtsus. Ühe molekuli sekveneerimine aitab uurida kasvaja geneetilist mitmekesisust ja analüüsida üksikute vähirakkude genome.

### 1.3.6. Suunatud süvasekveneerimine ehk *targeted deep sequencing*.

Suunatud süvasekveneerimine viiakse läbi teise põlvkonna sekvenaatoritel ja meetodi spetsiifilisus on suurem kui 97 protsenti (Forsheiw *et al.*, 2012). Peamised limiteerivad faktorid on hind, vajadus kõrge kvaliteediga DNA järele ning keerukas andmete analüüs (Crowley *et al.*, 2013). Vaatamata sellele on meetod väga perspektiivikas, kuna eeldatavasti muutub sekveneerimine tulevikus oluliselt odavamaks (Benesova *et al.*, 2013).

#### 1.4. Tsirkuleeriva rakuvaba DNA kasutamine vähi biomarkerina

Tsirkuleeriva tuumori DNAd esineb vereplasmas väga vähestes kogustes ning ctDNA kogused on sageli väga varieeruvad (Dawson *et al.*, 2013). cfDNA molekulide leidub mitte ainult vähihaigete või teisi haigusi põdevate patsientide vereplasma proovides vaid ka tervete inimeste veres. Enamasti on tervete inimeste cfDNA sisaldus vereplasmas küllaltki madal ning seda on võimalik detekteerida ainult kõrge tundlikkusega meetoditega (Jung *et al.*, 2010). Rakuvaba DNA esineb enamasti lühikeste fragmentidena (70 – 200 aluspaari), kuid lisaks on leitud veel pikemaid molekule, mille pikkus ulatub kuni 21 000 aluspaarini (Stroun *et al.*, 2001).

cfDNA sisaldus onkoloogiliste haigete veres on erinevate kasvaja puhul väga varieeruv. Paljudel vähipatsientidel on cfDNA sisaldus kõrgem kui tervetel doonoritel. Keskmiselt on cfDNA tase tervetel inimestel umbes 10 ng/ml ja enamasti ei ületa see 30 ng/ml (Schwarzenbach *et al.*, 2011; Tamkovich *et al.*, 2008). Kui tsirkuleeriva DNA sisaldus veres ületab 100 ng/ml, siis viitab see suure tõenäosusega mingile patoloogilisele protsessile (Anker *et al.*, 1975). Kõrgenenud cfDNA tase ei ole omane ainult vähipatsientidele. cfDNA tase võib olla tõusnud ka teiste haiguste korral, näiteks võivad tõusu kaasa tuua autoimmuunhaigused, põletikud ning healoomulised kasvajad (Schwarzenbach *et al.*, 2011).

Sekveneerimistehnoloogiate kiire areng võimaldab tuvastada somaatilisi muutusi kasvaja DNAs ja see omakorda aitab kaasa personaalse ravi kasutamisele, mis hõlmab kasvaja analüüsimist, haiguse kulgemise seiret ja ravi efektiivsuse hindamist (Dawson *et al.*, 2013, Schwarzenbach *et al.*, 2011).

Asjaolu, et rakuvaba DNA on väga tundlik biomarker, toob kaasa mitmeid aspekte, millele tuleb tähelepanu pöörata juba vereproovide korjamise ja töötlemise etapil. cfDNA kogus vereproovides sõltub:

- erinevate antikoagulantide kasutamisest vereplasma kogumisel,
- ajavahemikust, mis jääb proovi kogumise ja tsentrifugeerimise vahele,
- vereproovi hoiustamise temperatuurist enne tsentrifuugimist,
- tsentrifuugimise intensiivsusest,
- plasma hoidmistingimustest (aeg, temperatuur) pärast fuugimist (Jen *et al.*, 2000, Xue *et al.*, 2009).

DNA eraldamise efektiivsus ja kvaliteet sõltub otseselt eraldamise meetodikast. Näiteks on kahe erineva meetodi võrdlemisel leitud, et cfDNA saagikus varieerub rohkem kui 50% võrra (Kok *et al.*, 1998).

Kuna cfDNA hulgas võib esineda erineva pikkusega DNA fragmente, on DNA eraldamisel soovitatav kasutada mitut erinevat meetodit, mis võimaldaksid eraldada nii pikemaid kui ka lühemaid (< 100 aluspaari) cfDNA fragmente (Jung *et al.*, 2010; Herrera, 2004). Selline lähenemine välistaks suuri cfDNA kadusid eraldamise etapil.

Hetkel on kasutusel erinevad meetodid cfDNA eraldamiseks ja kontsentratsiooni mõõtmiseks (Jung *et al.*, 2010). Näiteks cfDNA saagikust on võimalik mõõta mitme meetodi abil:

- spektrofotomeetria, mis on lihtne, aga samas madala tundlikkusega meetod.
- fluoromeetria, mis on kõrge tundlikkusega ning kus kasutatakse erinevaid fluorestseeruvaid määrgiseid (näiteks PicoGreen, SYBR Green). Selle meetodika tundlikkus on kuni 1 ng/ml.
- polümeraasi ahelreaktsiooni abil. PCR'i analüüsi puhul on soovitatav kasutada võimalikult lühikest uuritavat järjestust. (Jung *et al.*, 2010)

#### **1.4.1. cfDNA kasutamine vähkkasvaja diagnoosimisel ning molekulaarsel iseloomustamisel**

Üks peamisi eesmärke cfDNA kasutamisel on vähirakkude genoomsete muutuste tuvastamine mitteinvasiivsel teel. Mitmed tööd on uurinud cfDNA võimalikku kasutamist biomarkerina vähi varajaseks avastamiseks. Nende uuringute tulemused näitasid, et lihtsalt cfDNA kontsentratsiooni kasutamine ei anna olulist lisainformatsiooni tavapäraste diagnoosimeetoditega võrreldes.

Üheks potentsiaalseks vähi biomarkeriks on tsirkuleeriva tuumori DNA metülatsioonitaseme määramine. DNA metülatsioon reguleerib mitmeid rakulisi protsesse nii tervetes kui ka kasvaja rakkudes (Begum *et al.*, 2011). Hüpometülatsioon on üks levinumaid muutusi kasvajarakkudes molekulaarsel tasemel. Samas võib esineda ka üksikute piirkondade hüpermetülatsiooni. Hüpermetülatsiooni käigus lisandub metüülrühm geeni promootori CpG saarel asuvatele tsütosiinidele, moodustades 5-metüültsütosiini. Paljude geenide promootoralades esineb CpG dinukleotiidide üle-esindatust ning nimetatud piirkondade metüleerimine on sageli seotud geeniekspressiooni allasurumisega (Lengauer *et al.*, 1998). Mitmete tuumor-supressor geenide promootoralades asuvad CpG saarekesed (Esteller *et al.*, 1998; Leary *et al.*,



2010). Metülatsioonimustri häirimine võib mõjutada geene, mis vastutavad rakutsükli kontrolli, DNA reparatsiooni, rakkude adhesiooni, rakuvahelise signaalülekanne või apoptoosi ja rakkude diferentseerumise eest. (Begum *et al.*, 2011).

On uuritud võimalust diagnoosida vähi vähispetsiifiliste geenide hüpermetülatsiooni määramise abil. Selleks määrati antud kasvaja diagnoosimiseks sobilikud geenid, näiteks mitteväherakulise kopsuvähi diagnoosimiseks kasutati kuue vähispetsiifilise geeni (*APC*, *AIM1*, *CDH1*, *DCC*, *MGMT* ja *RASSF1A*) metülatsioonitaseme uuringut. Antud geenid valiti põhjusel, et need olid kopsuvähispetsiifilised ning nende tundlikkus ja esinemissagedus metüleeritud vormis kopsuvähihaigetel olid kõrged (Begum *et al.*, 2011).

Vereproovist saadud seerumit analüüsiti kvantitatiivse metülatsioon-spetsiifilise PCR'i abil. Kui analüüsiti ainult ühe geeni (*DCC*) metülatsiooni taset, siis selle analüüsi spetsiifilisus oli 100%, kuid tundlikkus jäi suhteliselt madalaks – 35,5%. *DCC* geeni hüpermetülatsioon tuvastati 36% kopsuvähijuhtumite korral. Nende andmete põhjal võib järeldada, et 1/3 kogu kopsuvähijuhtumitest on võimalik diagnoosida ainult *DCC* geeni analüüsimise põhjal. Nendel patsientidel, kellel *DCC* geen oli tavapärase metüleerimismustriga, analüüsiti ülejäänud geenide (*APC*, *AIM1*, *CDH1*, *MGMT*, *RASSF1A*) metülatsiooni. Analüüsitulemuste kohaselt suurenes antud geenide tundlikkus kuni 75 protsendini, kuid spetsiifilisus langes 73 protsendini (Begum *et al.*, 2011).

Käesoleva meetodi eeliseks on asjaolu, et seda saab kasutada vähi diagnoosimiseks võimalikult varajases staadiumis, sest meetod on võrreldes seerumi valguliste biomarkeritega palju kõrgema tundlikkusega (Begum *et al.*, 2011).

#### **1.4.2. cfDNA kasutamine prognoosimisel**

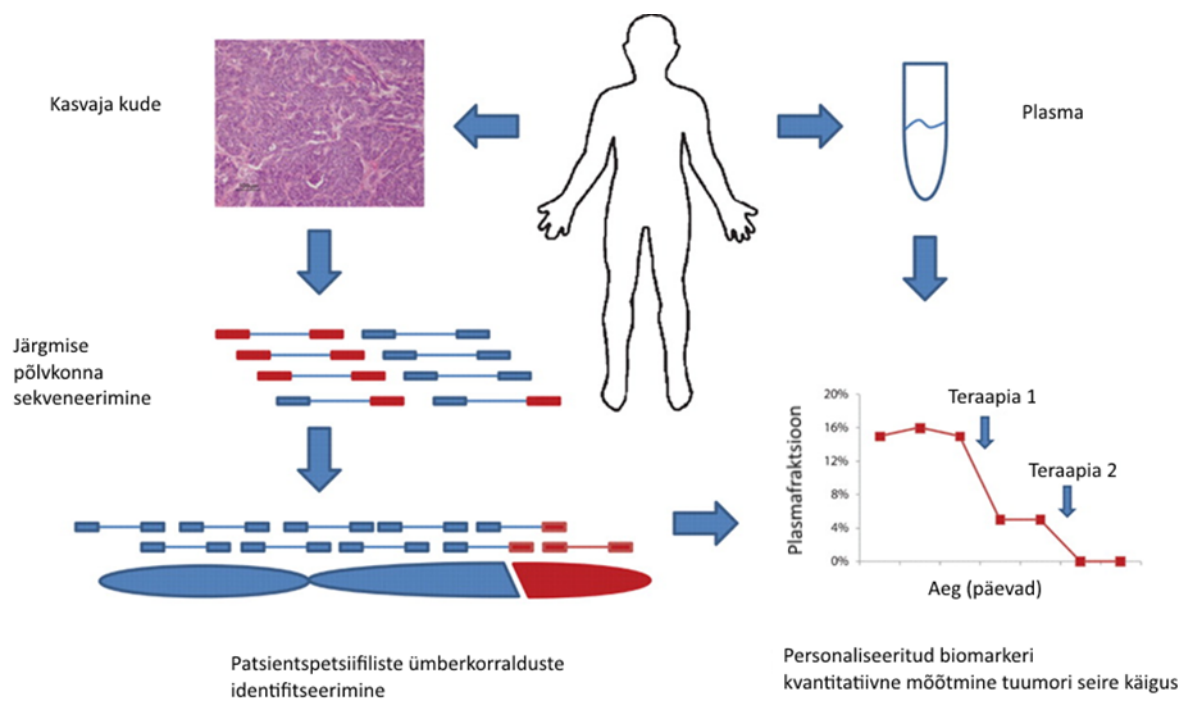
cfDNA taseme järgi võib ennustada haiguse kulgu ja ravivastust isegi vähi algstaadiumites (Dawson *et al.*, 2013). Enamiku maksa-, rinna-, kopsu-, munasarja- ja eesnäärmevähkide puhul korreleerus cfDNA kontsentratsioon patsientide elumusega. Kuid samas leidub andmeid, et teiste vähiliikide korral ei oma cfDNA nii head prognoosivõimet (Jung *et al.*, 2010).

cfDNA-d saab kasutada ka kirurgilise ravi ning kemoteeraapia efektiivsuse määramisel. Näiteks on leitud, et pärast rinna-, soole-, neeru- või kopsuvähi kirurgilist ravi on patsientidel cfDNA tase langenud (Jung *et al.*, 2010). cfDNA taseme tõus pärast kirurgilist ravi viitab sellele, et haigus võib olla progresseerunud.

Lisaks aitab cfDNA taseme kontroll ennustada vähi taasteket ehk retsidiivi (Banki *et al.*, 2007). Retsidiivi korral on cfDNA väga tundlik biomarker, sest see võib anda märku haiguse taastekke kohta varem kui teised biomarkerid (näiteks CAE - kartsinoembrüonaalne antigeen) (Banki *et al.*, 2008).

Samuti on võimalik kasutada cfDNAd haiguse prognoosimisel, jälgides cfDNA muutusi molekulaarsel tasandil. Näiteks üheks universaalseks vähi tunnusjooneks on kromosomaalne ebastabiilsus, mis põhjustab kromosoomide struktuurset ümberkorraldusi (näiteks inversioonid, insertioonid, translokatsioonid ja koopiaarvu muutused) (Lengauer *et al.*, 1998). Nimetatud struktuursed muutused võivad toimuda juba varases kantserogeneesis. Kromosomaalsete tuumorspetsiifiliste ümberkorralduste määramine on oluline saavutus personaalmeditsiini valdkonnas, kuna see on väga tundlik vähimarker, mida kasutatakse põhiliselt haiguse kulu jälgimiseks ja kirurgilise ravi ning kemoteraapia efektiivsuse määramiseks. Meetodit, mis põhineb antud vähibiomarkeril, nimetatakse PARE (*Personalized Analysis of Rearranged Ends*). PARE meetodi abil on võimalik määrata patsiendispetsiifilisi ümberkorraldusi kasvaja proovides, kasutades teise põlvkonna sekveneerimist. Selleks on vaja võtta DNA proovid nii kasvajakoe kui ka terve koest. Kromosomaalseid vähispetsiifilisi ümberkorraldusi on võimalik tuvastada kahel viisil. Esiteks, võrreldes terve koe ja kasvajakoe DNAd ja identifitseerides genoomsed positsioonid, mis on komplementaarsed, kuid pärinevad erinevatest kromosoomidest (interkromosomaalsed ümberkorraldused). Teiseks, saadud andmeid kasutades analüüsida koopiaarvu variatsioone ja tuvastada tuumor-spetsiifilised koopiaarvu muutused (Leary *et al.*, 2010).

PARE meetodit iseloomustab kõrge tundlikkus ja spetsiifilisus. Analüüsi käigus identifitseeritakse enamik somaatilisi tuumor-spetsiifilisi ümberkorraldusi ja eeldatavalt jääb tuvastamata ainult väga väike osa muutustest. Seda puudust on võimalik kompenseerida kasutades korraga mitut PARE biomarkerit, mis on spetsiifilised erinevate kromosomaalsete regioonide suhtes. Veel üheks puuduseks on meetodi kõrge hind. Laborikatsete etapil maksis ühe patsiendi analüüs 5000 USA dollarit, mis on suhteliselt kallis kliiniliseks kasutamiseks (Leary *et al.*, 2010).



R. J. Leary et al., Sci Transl Med 2010;2:20ra14



**Joonis 3.** PARE meetod. Kohandatud Leary *et al.*, 2010 järgi.

## EKSPERIMENTAALNE OSA

### 1. Töö eesmärgid.

Eksperimentaalse osa eesmärgiks oli testida vereplasmast rakuvaba DNA eraldamise ja selle koguse määramise metoodikat.

### 2. Materjal ja metoodika.

Tsirkuleeriv DNA eraldati kahest vereplasma proovist (27416 ja 51742), mis olid kogutud anonüümsetelt geenidoonoritelt aastal 2009. Veri koguti EDTA Vacutainer'isse ja fuugiti Eppendorf 5810R fuugiga 2000 rpm 15 min. Plasma tõsteti 2 ml krüotuubidesse ja seda säilitatakse -80°C juures. Uuringuks oli olemas TÜ eetikakomitee luba (228/T-13) ning kõik uuritavad allkirjastasid informeeritud nõusoleku vormi.

#### 2.1. Tsirkuleeriva rakuvaba DNA eraldamine.

DNA eraldamiseks kasutati NucleoSpin Plasma XS kit'i (Macherey-Nagel GmbH & Co, Saksamaa). Antud komplekt on ette nähtud fragmenteerunud rakuvaba DNA eraldamiseks vereplasmast ning sellega on võimalik eraldada DNA fragmente pikkusega 50 – 1000 aluspaari. Enne DNA eraldamist valmistati Proteinaas K lahus. Selleks lisati 30 g Proteinaas K lüofiliseeritud pulbrile 1,35 ml proteinaasi puhvrit. Saadud lahust säilitati -20°C juures.

DNA eraldamiseks kasutati *High sensitivity* (kõrge tundlikkusega) protokoll. Eraldamiseks kanti 240 µl plasmat 1,5 ml tuubi, kuhu lisati 1 µl IPC DNAd (TaqMan® Mutation Detection IPC Reagent Kit (Applied Biosystems, kataloogi nr. 4467538)) mis on vajalik DNA eraldamise efektiivsuse määramiseks. IPC näol on tegemist eksogeense sünteetilise DNAGA, mille jaoks on olemas spetsiifiline TaqMan sond. Proovile lisati 20 µl Proteinaas K lahust, segati ja inkubeeriti 37°C juures 10 minutit. Seejärel lisati 360 µl sidumispuhvrit. Reagendi ja plasma segu segati loksutades, seejärel vortexiga ja tsentrifuugiti lühidalt. Proov tõsteti NucleoSpin Plasma XS kolonni ja tsentrifuugiti toatemperatuuril 30 sekundi jooksul 2000 x g juures ning seejärel 5 sekundit 11 000 x g juures. Kogumistuubi asendati uue 1.5 ml tuubiga. Järgmisena pesti membraani pesupuhvriga. Esiteks kanti NucleoSpin kolonni 500 µl pesupuhvrit ja tsentrifuugiti toatemperatuuril 11 000 x g juures 30 sekundit. Kogumistuub asendati uuega ja kolonni lisati 250 µl pesupuhvrit ning tsentrifuugiti 3 minutit 11000 x g juures. Elueerimiseks asendati kogumistuub jälle puhta tuubiga ning kolonni membraani

keskele lisati 20 µl elueerimispuhvrit. Tsentrifuugiti 11 000 x g juures 30 sekundit ja elueeritud fraktsiooni inkubeeriti avatud korgiga 90°C juures 8 minutit, et aurustada etanooli jäägid. Lõpuks jäi elueerimistuubi 12-14 µl DNA lahust.

## **2.2.Eraldatud DNA ja standardlahuste kontsentratsioonide kontroll**

Standartlahused olid algselt valmistatud kasutades spektrofotomeetri NanoDrop abil määratud kontsentratsiooni. Analüüsiks kasutati 10 ng/µl, 1 ng/µl ja 0,1 ng/µl kontsentratsioonidega standartlahused. Töö hilisemas staadiumis oli proovide kontsentratsiooni täpsemaks mõõtmiseks võimalik kasutada Qubit® 2.0 fluoromeetrit (Life Technologies, kataloogi number Q32866). Qubit® 2.0 fluoromeetri tundlikkuse piir oli 0.2-100 ng.

Kontsentratsiooni kontrolli tulemustest võib järeldada, et standardlahuste kontsentratsioonides esines väikesi kõikumisi, mis võib olla tingitud pipeteerimisvigadest või Nanodropi ja Qubit'i puhul kasutatavate meetodikate erinevusest. Qubit'i abil määratud kontsentratsioonid olid 10 ng/µl standardlahuse puhul 8,8 ng/µl ja 1 ng/µl standartlahuse puhul 0,97 ng/µl. Nii 0,1 ng/µl kui ka uuritavate DNAd kontsentratsioone ei olnud võimalik mõõta, kuna need väärtused olid alla fluoromeetri tundlikkuse piiri.

## **2.3.Kvantitatiivne reaalaaja PCR (qPCR)**

Eraldatud rakuvaba DNA koopiarvu mõõtmiseks kasutati kvantitatiivset reaalaaja PCR'i (ABI Prism 7900HT, Applied Biosystems). Selleks kasutati reaktsioonisegu Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific, kataloogi nr. #K0233) ja kommertsiaalset TaqMan reagentide süsteemi: TaqMan® Mutation Detection IPC Reagent Kit (Applied Biosystems, kataloogi nr. 4467538), TaqMan® Copy Number Reference Assay, human, RNaseP (Applied Biosystems, kataloogi nr. 4403326), TaqMan® Copy Number Reference Assay, human, TERT (Applied Biosystems, kataloogi nr. 4403316). *TERT* ja *RNaseP* lookused on esindatud inimese haploidse genoomis ainult ühte koopiana ja tootja soovib vastavaid sonde kasutada koopiarvu määramiseks. Kõikide sondide puhul oli fluorestsentsmärgiseks VIC ja kustutavaks fluorofooriks (*quencher*) TAMRA.

Kõik reaktsioonid tehti kolmes korduses kasutades ABgene 384 PCR-plaati (Thermo Scientific, kataloogi nr. AB-1055). Iga reaktsiooni lõppmahuks oli 10 µl. Negatiivse kontrollina kasutati ilma DNAta reaktsioonisegu.

Plasmas sisalduva DNA hulga määramiseks kasutati eelnevalt määratud kontsentratsiooniga genoomse DNA lahjenduste rida (10 ng/μl, 1 ng/μl, 100 pg/μl, 10 pg/μl ja 1 pg/μl). IPC reaktsioonide jaoks valmistati 1x, 10x, 100x ja 1000x lahjendused.

**Tabel 1:** Reaal-aja qPCR'i reaktsiooni segu IPC sondi jaoks.

Reagent	μl
5X Hot Firepol probe	2
qPCR mix	
IPC Mix	1
DNA	1
milliQ H <sub>2</sub> O	6
Kogumaht	10

**Tabel 2:** Reaal-aja qPCR'i reaktsiooni segu *RNaseP* ja *TERT* sondide jaoks.

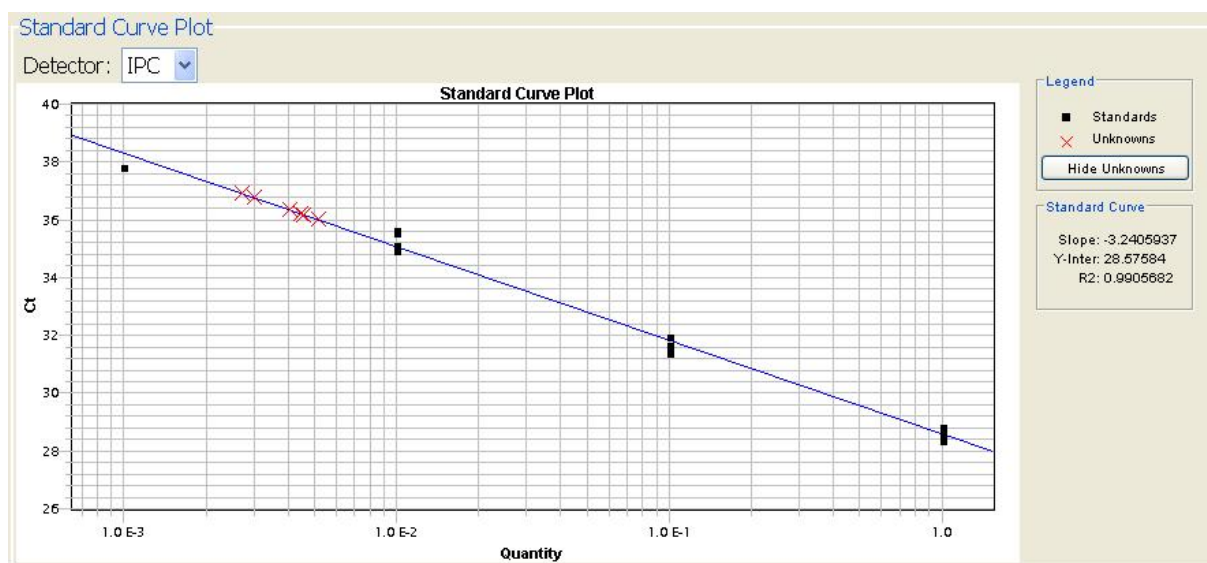
Reagent	μl
5X Hot Firepol probe	2
qPCR mix	
RNaseP või TERT Mix	0,5
DNA	1
milliQ H <sub>2</sub> O	6,5
Kogumaht	10

**Tabel 3:** Reaal-aja qPCR'i programm.

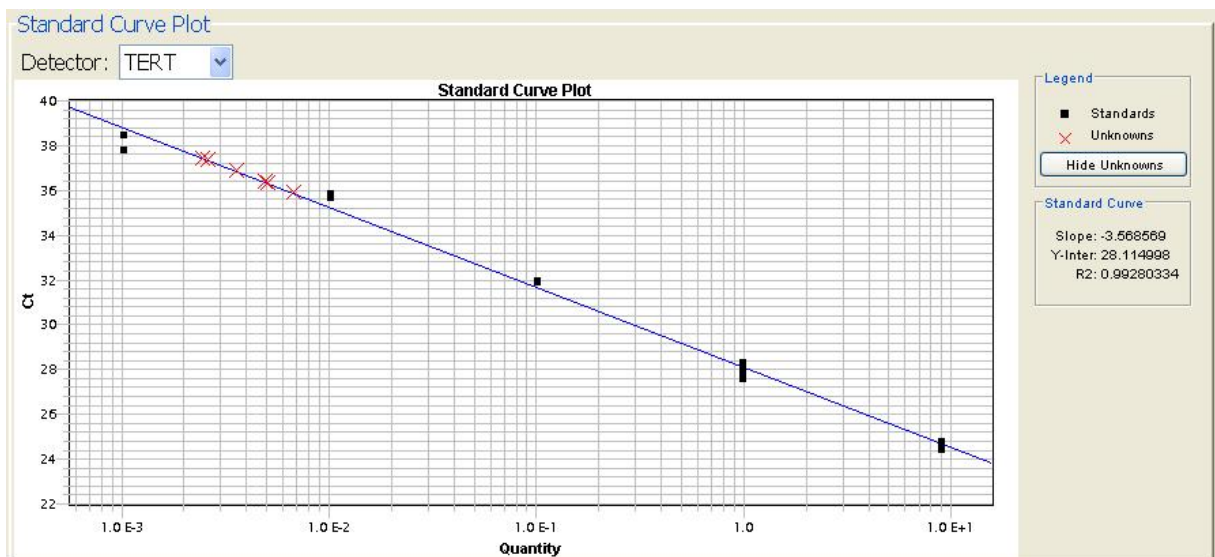
Temperatuur °C	Aeg	Tsüklite arv
95 °C	10 min	1
95 °C	15 sek	40
60 °C	60 sek	40

## 2.4.qPCR andmete analüüs

Kvantitatiivse reaal-aja PCR'i ekspressiooni andmeid analüüsiti SDS 2.4. (Applied Biosystems) programmi abil. *TERT* ja *RNaseP* geenide koopiaarvu mõõtmiseks kasutati absoluutse kvantiseerimise meetodit. Tulemused arvutati lahjenduste rea abil saadud standardkõvera meetodi abil.



**Joonis 4:** Näide DNA standardlahjenduste põhjal valmistatud standardkõverast IPC analüüsiks. Mustad ruudukesed tähistavad standardlahuseid ning ristid uuritavaid lahuseid.



**Joonis 5:** DNA standardlahjenduste põhjal valmistatud standardkõver *TERT* geeni analüüsiks. Mustad ruudukesed tähistavad standardlahuseid ning ristid uuritavaid lahuseid.

Saadud andmete põhjal arvutati välja *RNaseP* ja *TERT* koopiaarv ja kogus doonori vereplasmas, lähtudes sellest, et inimese haploidne genoom sisaldab 3,3 pg DNAd.

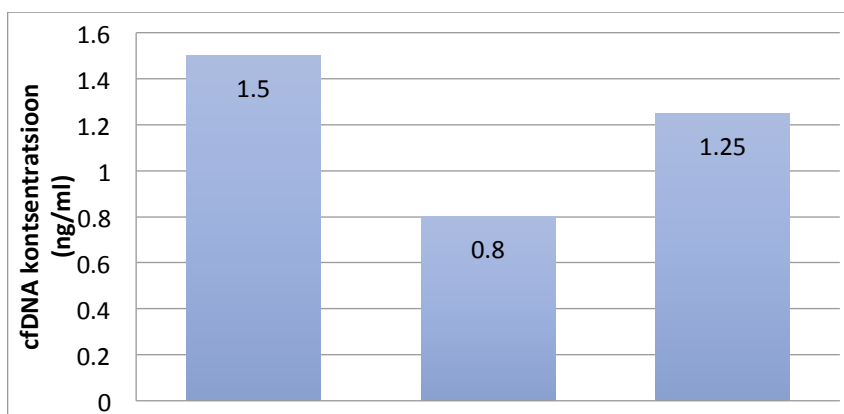
Tsirkuleeriva DNA eraldamise efektiivsus määrati IPC lahjenduste rea abil. Plasma DNA eraldamise käigus lisati reaktsiooni 1 µl IPC DNAd. Kui eraldamise lõppmaht oli 50 µl, siis järelkult IPC DNA oli lahjendatud 50 korda. Pärast qPCR'i teostamist arvutati, milline oli algselt eraldamisreaktsiooni lisatud IPC DNA saagise protsent.



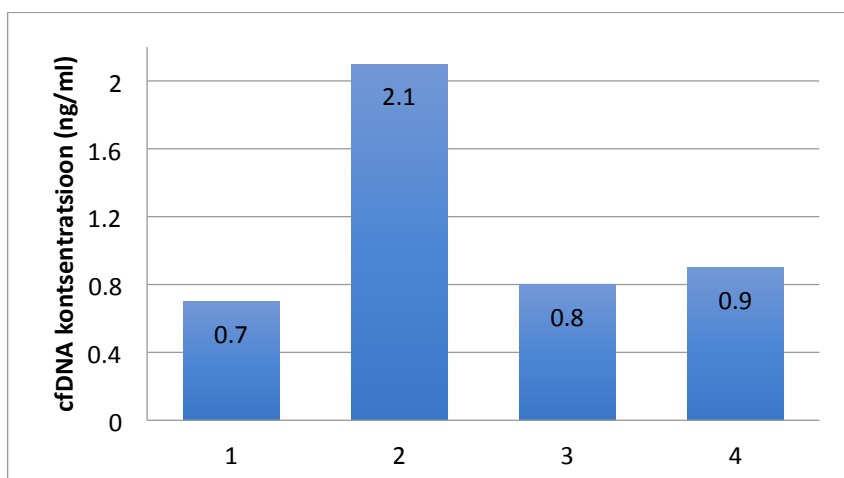
### 3. Tulemused ja arutelu.

Antud töö eksperimentaalses osas viidi läbi tsirkuleeriva rakuvaba DNA eraldamise katsed koos eraldatud DNA kontsentratsiooni määramisega ja eraldamise efektiivsuse hindamisega. Kokku viidi läbi kolm cfDNA eraldamise katset. Kahe esimese eraldamise käigus saadud DNA lahjendati milliQ veega 50 µl-ni ning viimasel eraldamisel kogutud DNA lahjendati 20 µl-ni milliQ veega.

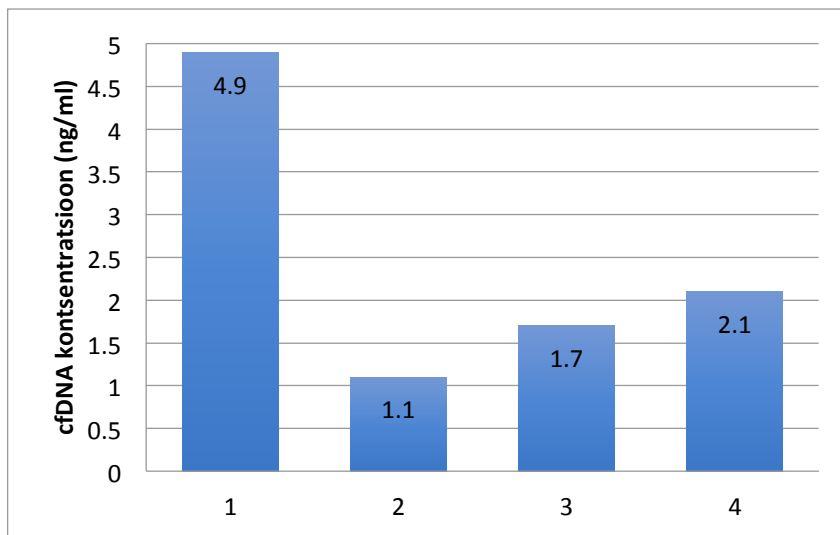
Tsirkuleeriva rakuvaba DNA kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati *RNaseP* ja *TERT* sonde. SDS 2.4. (Applied Biosystems) programmi abiga arvutati välja cfDNA hulk ühes mikrolitris eraldatud DNAs. Saadud andmete põhjal arvutati cfDNA kogus ühe milliliitri plasma kohta iga DNA proovi ja sondi puhul eraldi. Tulemused on esitatud graafilisel kujul joonistel 6-9.



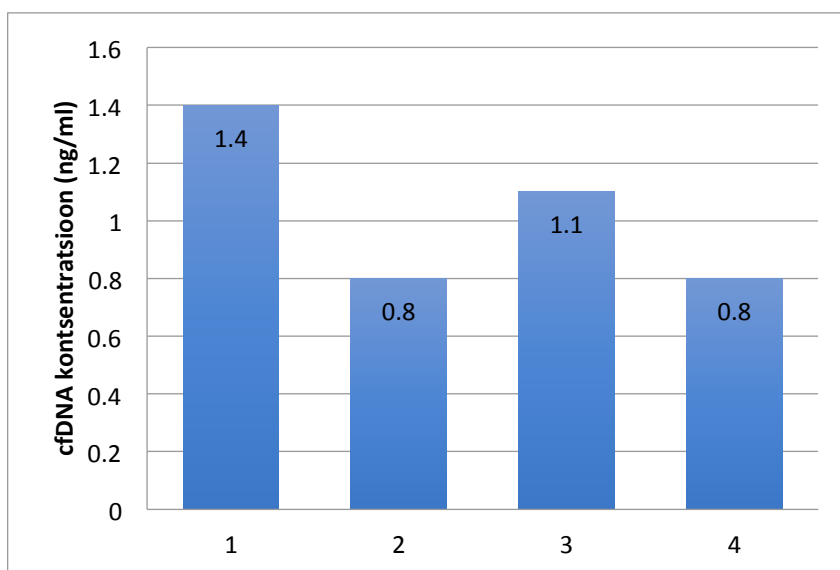
**Joonis 6.** Plasmaproovi №27416 tsirkuleeriva rakuvaba DNA kogus plasma milliliitri kohta *RNaseP* geeni analüüsi põhjal.



**Joonis 7.** Plasmaproovi №27416 tsirkuleeriva rakuvaba DNA kogus plasma milliliitri kohta *TERT* geeni analüüsi põhjal.



**Joonis 8.** Plasmaproovi №51742 tsirkuleeriva rakuvaba DNA kogus plasma milliliitri kohta *RNaseP* geeni analüüsi põhjal.



**Joonis 9.** Plasmaproovi №51742 rakuvaba DNA kogus plasma milliliitri kohta *TERT* geeni analüüsi põhjal.

Ülaltoodud tulemuste põhjal arvutati välja keskmine cfDNA sisaldus mõlemas plasmaproovis. Plasmaproovis №27416 oli keskmine cfDNA kontsentratsioon 1,16 ng/ml ning plasmaproovi №51742 puhul 1,76 ng/ml.

Saadud tulemused on võrreldavad eelnevalt avaldatud katsete tulemustega. cfDNA kogus vähipatsientidel võib kõikuda vahemikus 7 ng/ml (Crowley *et al.*, 2013) kuni 1200 ng/ml ning tervetel inimestel on cfDNA hulk tavaliselt mitte kõrgem kui 15 ng/ml (Jahr *et al.*, 2001), olles keskmiselt 3,7 ng/ml (Jahr *et al.*, 2001). Suurem osa selles töös saadud cfDNA kogused

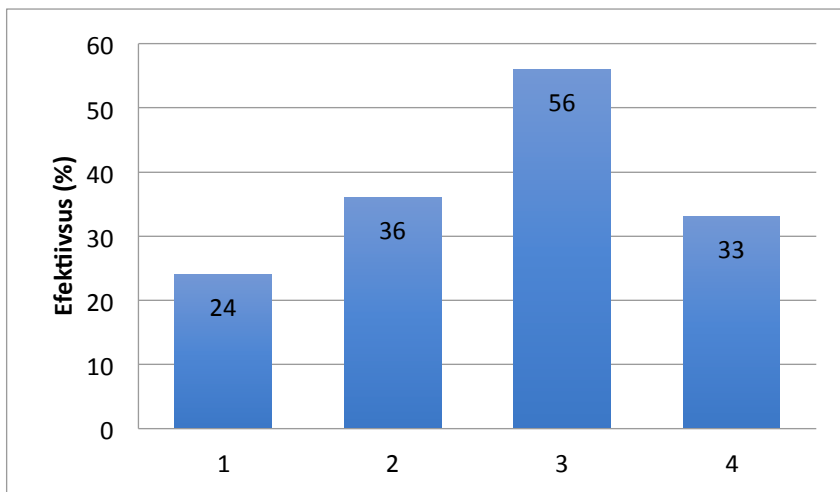
olid alla 2 ng/ml, kõige kõrgema kontsentratsiooniga proov sisaldas 4,9 ng/ml, mis jääb normaalse varieeruvuse piiridesse. Edaspidistes analüüsides tuleb kindlasti arvesse võtta ka PCR'i efektiivsust. Käesolevas töös kõikus see 85% ja 110% protsendi vahel, mis võib olla osaliselt tingitud väga madala kontsentratsiooniga lahjenduste kasutamisest.

Samuti määrati keskmine DNA koopiaarv *RNaseP* ja *TERT* lookuste põhjal. *RNaseP* lookuse põhjal saadud koopiaarv oli plasma ühe milliliitri kohta keskmiselt 359 koopiat plasmaproovi 27416 korral ja 742 koopiat plasmaproovi 51742 korral. Koopiaarvu väärtused kõikusid 242 ja 1485 vahel. *TERT* lookuse põhjal saadud koopiaarvu väärtused näitasid väiksemat varieeruvust ja jäid 310-341 koopiaarvu vahele. Koopiaarvu väärtused varieerusid 212 ja 424 vahel. Eelnevate uurimistöödega võrreldes, olid meie poolt saadud tulemused peaaegu kaks korda madalamad (Devonshire *et al.*, 2014).

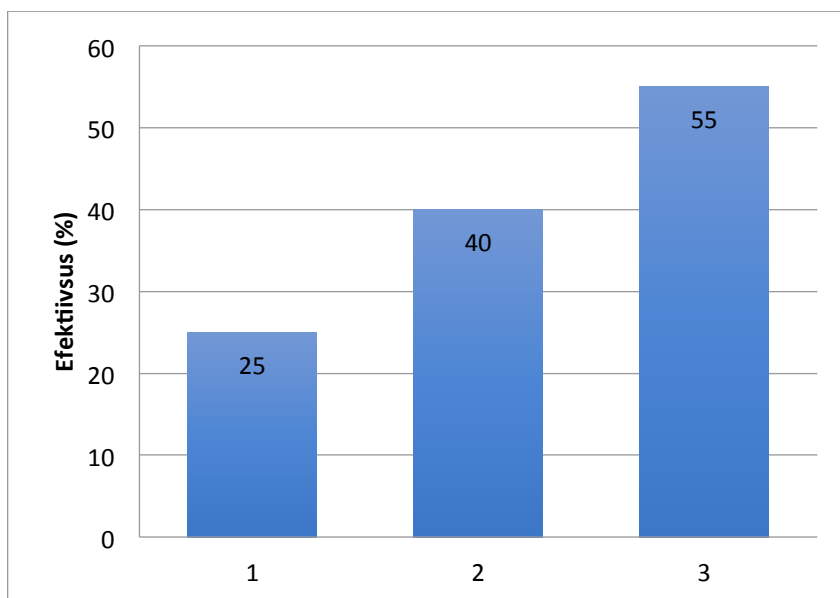
**Tabel 4:** *RNaseP* ja *TERT* lookuste keskmised koopiaarvu väärtused milliliitri vereplasma kohta proovide №27416 ja №51742 puhul.

	<b>Plasma № 27416</b>	<b>Plasma № 51742</b>
<i>RNaseP</i> (koopiat/ml)	359 (242 - 455)	742 (333 – 1485)
<i>TERT</i> (koopiat/ml)	341 (212 – 636)	310 (242 – 424)

Plasmas tsirkuleeriva DNA eraldamise efektiivsust uuriti lisades eraldamisreaktsiooni sünteetilist IPC DNAd. Pärast eraldamist kontrolliti, kui suur oli IPC DNA saagis võrreldes tegelikult reaktsiooni lisatud DNAGA. Eraldamise efektiivsus määrati iga plasmaproovi jaoks eraldi kasutades mitme PCR'i tulemusi. Saadud tulemused on esitatud graafilisel kujul joonistel 10-11. Keskmine eraldamise efektiivsus plasmaproovide №27416 ja №51742 jaoks oli vastavalt 37% ja 40%.



**Joonis 10.** Plasmaproovi №27416 rakuvaba DNA eraldamise efektiivsus (%) mõõdetuna IPC DNA saagise alusel.



**Joonis 11.** Plasmaproovi №51742 rakuvaba DNA eraldamise efektiivsus (%) mõõdetuna IPC DNA saagise alusel.

## Kokkuvõte

Töö eesmärgiks oli anda põhjalik ülevaade tsirkuleeriva rakuvaba DNA rollist vähi diagnoosimisel ja ravivastuse ning haiguskulu prognoosimisel ning samuti vähiravi tulemuslikkuse määramisel. Kirjanduse ülevaate osas kirjeldati tsirkuleeriva rakuvaba DNA bioloogilist tausta ja päritolu ning arutleti cfDNA eraldamise ja analüüsi meetodite üle.

Tsirkuleeriv rakuvaba DNA esineb vereplasmas väga väikestes kogustes. Tervetel inimestel ei ületa cfDNA kontsentratsioon tavaliselt 15 ng/ml. Vähihaigete puhul on rakuvaba DNA kontsentratsiooni varieeruvuse piirid väga laiad –10 ng/ml ja 1000 ng/ml vahel. Tsirkuleeriva rakuvaba DNA kogus vereplasmas on väga individuaalne ja tavaliselt varieerub tugevasti ka ühe vähitüübi puhul. Sellest lähtudes kasutatakse cfDNA uuringuid järjest rohkem personaalse meditsiini valdkonnas. Kliinilistes uuringutes võiks cfDNA olla perspektiivseks vähi biomarkeriks, kuna näitab erakordselt kõrget tundlikkust ja annab kiire vastuse läbiviidud ravikuuri toime kohta.

Kõesoleva töö eksperimentaalses osas viidi läbi cfDNA eraldamine anonüümsete veredoonirite plasmast. Eraldamiseks kasutati kommertsiaalset cfDNA eraldamise komplekti. Määrati eraldatud cfDNA hulk, kasutades selleks kvantitatiivset reaal-aja PCR'i kahe lookuse (*RNaseP* ja *TERT*) suhtes. Lisaks kontrolliti cfDNA eraldamise efektiivsust IPC lahjendusrea abil. Saadud tulemused olid kooskõlas antud valdkonnas eelnevalt tehtud uuringutega.

## Use of circulating cell-free DNA as a cancer biomarker

Ustina Põnova

### SUMMARY

Cancer is a leading cause of death worldwide accounting for 8.2 million deaths in 2012. 14.1 million cancer cases are diagnosed every year (web: *the World Health Organization*, 2015)

Early detection of cancer is the most relevant way to reduce its incidence. Due to the fact that early detection of cancer turns out to be difficult in many cases, predicting of the disease as well as the effective treatment are also complicated. Nowadays it is possible to detect an early-stage cancer by different cancer biomarkers. One of the promising cancer biomarkers is circulating cell-free DNA (cfDNA), which is found in human blood plasma. cfDNA is a double-stranded molecule of low-molecular weight that is fragmented into short (70–200 base pairs) and long sections (up to 21 kilobases) (Jahr *et al.*, 2001). It is assumed that the main source of cfDNA is primarily apoptosis of normal cells and necrosis of cancer cells (Diehl, 2005; Jahr *et al.*, 2001). Some studies have suggested the active release of cfDNA by lymphocytes (Anker *et al.*, 1975). Furthermore, viral and mitochondrial DNA in human blood plasma has been also detected (Schwarzenbach *et al.*, 2011).

Circulating tumor DNA presents in plasma in very small quantities. It is known that amount of cfDNA in plasma of cancer patient is often increased. On average, the level of cfDNA in healthy individuals is about 10 ng / ml, and in most cases it does not exceed 30 ng / ml (Schwarzenbach *et al.*, 2011; Tamkovich *et al.*, 2008). The amount of cfDNA in cancer patients may vary in the range of 7 ng / ml to 1200 ng / ml (Crowley *et al.*, 2013, Jahr *et al.*, 2001)

Cancer patient's cell-free DNA consist of tumor DNA and non-tumor DNA fragments. The amount of circulating tumor DNA (ctDNA) can greatly vary within a single type of cancer. It is possible to evaluate the amount of cfDNA as well as the quantity of ctDNA. The amount of circulating tumor DNA can be measured by tumor-specific markers like point substitutions, DNA hypermethylation of tumor suppressor gene promoters, proto-oncogene and tumor suppressor gene modifications (including short deletions and extensions) (Benesova *et al.*, 2013).

The purpose of practical part of current Bachelor's thesis was to extract circulating cell-free DNA from blood plasma of two healthy donors and to measure the concentration of extracted

DNA. cfDNA was extracted three times by NucleoSpin Plasma XS kit (Macherey-Nagel GmbH & Co, Germany). The amount of extracted DNA was determined by quantitative PCR. To quantify the copy number of cfDNA we used endogenous reference genes *RNase P* and *TERT*. The results were calculated by standard curve method. The average concentration of cfDNA per milliliter of plasma was 1,16 ng / ml for the first donor and 1,76 ng / ml for the second donor. We also were able to measure the recovery of cfDNA extraction by analyzing the internal positive control (IPC) extraction efficiency. The recovery of extraction shows the range between 37% and 40%. The results of the practical part were correlated with the others studies results in this area.

In conclusion, circulating cell-free DNA is a perspective cancer biomarker because of its high sensitivity and ability to monitor treatment response. The amount of cfDNA is individual for each patient and may greatly vary from one person to another. Therefore cfDNA is a suitable cancer biomarker for personalized medicine.

## **Kasutatud kirjandus**

Anker P., Stroun M., Maurice PA. (1975). Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes shown in an in vitro system. *Cancer Res.* 35: 2375–2382

Banki, F., Mason R. J., Oh D., Hagen J. A., Demeester S. R., Lipham J. C., Tanaka K., Danenberg K. D., Yacoub W. N., Danenberg P. V., Demeester T. R. (2007). Plasma DNA as a Molecular Marker for Completeness of Resection and Recurrent Disease in Patients With Esophageal Cancer. *Archives of Surgery* 142.6: 533-39.

Banki F., Yacoub W.N., Hagen J.A., Mason R.J., Ayazi S., Demeester S. R., Lipham J. C., Danenberg K., Danenberg P., Demeester T.R. (2008). Plasma DNA Is More Reliable than Carcinoembryonic Antigen for Diagnosis of Recurrent Esophageal Cancer. *Journal of the American College of Surgeons* 207.1: 30-35.

Begum, S., Brait M., Dasgupta S., Ostrow K. L., Zahurak M., Carvalho A. L., Califano J. A., Goodman S. N., Westra W. H., Hoque M. O., Sidransky D. (2011). An Epigenetic Marker Panel for Detection of Lung Cancer Using Cell-Free Serum DNA. *Clinical Cancer Research* 17.13: 4494-503.

Benesova, L., Belsanova B., Suchanek S., Kopeckova M., Minarikova P., Lipska L., Levy M., Visokai V., Zavoral M., Minarik M. (2013). Mutation-based Detection and Monitoring of Cell-free Tumor DNA in Peripheral Blood of Cancer Patients. *Analytical Biochemistry* 433.2: 227-34.

Bidard F.C., Weigelt B., Reis-Filho J. S. (2013). Going with the Flow: From Circulating Tumor Cells to DNA. *Science Translational Medicine* 5.207: 207ps14.



Bischoff, F. Z. (2004). Cell-free Fetal DNA in Maternal Blood: Kinetics, Source and Structure. *Human Reproduction Update* 11.1: 59-67.

Bjørheim J., Minarik M., Gaudernack G., Ekstrøm P.O. (2003). Evaluation of Denaturing Conditions in Analysis of DNA Variants Applied to Multi-capillary Electrophoresis Instruments. *Journal of Separation Science* 26.12-13: 1163-168.

Boni L., Cassinotti E., Canziani M., Dionigi G., Rovera F., Dionigi R. (2007). Free Circulating DNA as Possible Tumour Marker in Colorectal Cancer. *Surgical Oncology* 16: 29-31.

de Bruin E.C., Medema J.P. (2008). Apoptosis and Non-apoptotic Deaths in Cancer Development and Treatment Response. *Cancer Treatment Reviews* 34.8: 737-49.

Carotenuto P., Roma C., Cozzolino S., Fenizia F., Rachiglio A.M., Tatangelo F., Iannaccone A., Baron L., Botti G., Normanno N. (2012). Detection of KRAS mutations in colorectal cancer with Fast COLD-PCR. *Int. J. Oncol.* 40: 378-384.

Chen, Z., Fadiel A., Naftolin F., Eichenbaum K.D., Xia Y. (2005). Circulation DNA: Biological Implications for Cancer Metastasis and Immunology." *Medical Hypotheses* 65.5: 956-61.

Choi, J.J., Reich C.F., Pisetsky D.S. (2005). The Role of Macrophages in the in Vitro Generation of Extracellular DNA from Apoptotic and Necrotic Cells. *Immunology* 115.1: 55-62.

Crowley E., Di Nicolantonio F., Loupakis F., Bardelli A. (2013). Liquid Biopsy: Monitoring Cancer-genetics in the Blood. *Nature Reviews Clinical Oncology* 10.8: 472-84.

Dawson S.J., Tsui D.W.Y, Murtaza M., Biggs H., Rueda O.M., Chin S.F., Dunning M.J., Gale D., Forshew T., Mahler-Araujo B., Rajan S., Humphray S., Becq J., Halsall D., Wallis M, Bentley D., Caldas C., Rosenfeld N. (2013). Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 368.13: 1199-209.

Deligezer U., Yaman F., Erten N., Dalay N. (2003). Frequent Copresence of Methylated DNA and Fragmented Nucleosomal DNA in Plasma of Lymphoma Patients. *Clinica Chimica Acta* 335.1-2: 89-94.

Dennis Lo Y. M., Chan L.Y.S., Lo K.W., *et al.* (1999). Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 59:1188-1191.

Devonshire A.S., Whale A.S., Gutteridge A., Jones G., Cowen S., Foy C.A., Huggett J.F. (2014). Towards Standardisation of Cell-free DNA Measurement in Plasma: Controls for Extraction Efficiency, Fragment Size Bias and Quantification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry Anal Bioanal Chem* 406.26: 6499-512.

Diehl, F. (2005). Detection and Quantification of Mutations in the Plasma of Patients with Colorectal Tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.45: 16368-6373.

Diehl F., Schmidt K., Durkee K.H., Moore K.J., Goodman S.N., Shuber A.P., Kinzler K.W., Vogelstein B. (2008). Analysis of Mutations in DNA Isolated From Plasma and Stool of Colorectal Cancer Patients. *Gastroenterology* 135.2: 489-98.e7.

Diehl F. , Smergliene E. (2013). BEAMing for Cancer Detecting Tumor Mutations in Peripheral Blood Using Digital PCR; *GEN*, Vol. 33, No. 15.

Esteller M., Levine R., Baylin S.B., Ellenson L.H., Herman J.G. (1998). MLH1 Promoter Hypermethylation Is Associated with the Microsatellite Instability Phenotype in Sporadic Endometrial Carcinomas. *Oncogene* 17.18: 2413-417.

Farber E. (1994). Programmed cell death: necrosis versus apoptosis. *Modern Pathol*; 7:605–9.

Fong, S. L., Zhang J. T., Lim C. K., Eu K. W., Liu Y. (2009). Comparison of 7 Methods for Extracting Cell-Free DNA from Serum Samples of Colorectal Cancer Patients. *Clinical Chemistry* 55.3: 587-89.

Forsheew T., Murtaza M., Parkinson C., Gale D., Tsui D. W. Y., Kaper F., Dawson S.-J., Piskorz A. M., Jimenez-Linan M., Bentley D., Hadfield J., May A. P., Caldas C., Brenton J. D., Rosenfeld N. (2012). Noninvasive Identification and Monitoring of Cancer Mutations by Targeted Deep Sequencing of Plasma DNA. *Science Translational Medicine* 4.136: 136ra68.

Frattini M., Gallino G., Signoroni S., Balestra D., Lusa L., Battaglia L., Sozzi G., Bertario L., Leo E., Pilotti S., Pierotti M.A. (2008). Quantitative and Qualitative Characterization of Plasma DNA Identifies Primary and Recurrent Colorectal Cancer. *Cancer Letters* 263.2: 170-81.

González-Masiá J. A., García-Olmo D., García-Olmo D. C. (2013). Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum (CNAPS): Applications in Oncology. *OncoTargets and Therapy* 6: 819-32.

He Y., Wu J., Dressman D.C., Iacobuzio-Donahue C., Markowitz S.D., Velculescu V.E., Diaz L.A.Jr, Kinzler K.W., Vogelstein B., Papadopoulos N. (2010). Heteroplasmic Mitochondrial DNA Mutations in Normal and Tumour Cells. *Nature* 464.7288: 610-14.

Herrera, L. J. (2004). Quantitative Analysis of Circulating Plasma DNA as a Tumor Marker in Thoracic Malignancies. *Clinical Chemistry* 51.1: 113-18.

Holdhoff, M., Schmidt K., Diehl F., Aggrawal N., Angenendt P., Romans K., Edelstein D. L., Torbenson M., Kinzler K. W., Vogelstein B., Choti M. A., Diaz L. A. (2011). Detection of Tumor DNA at the Margins of Colorectal Cancer Liver Metastasis. *Clinical Cancer Research* 17.11: 3551-557.

Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D., Fackelmayer F.O., Hesch R.D., Knippers R. (2001). DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. *Cancer Res.* 61(4):1659-65.

Jen, J., Wu L., Sidransky D. (2000). An Overview on the Isolation and Analysis of Circulating Tumor DNA in Plasma and Serum. *Annals of the New York Academy of Sciences* 906.1: 8-12.

Jung, K., Fleischhacker M., Rabien A. (2010). Cell-free DNA in the Blood as a Solid Tumor Biomarker—A Critical Appraisal of the Literature. *Clinica Chimica Acta* 411.21-22: 1611-624.

Kim, B. K. *et al.* (2008). Persistent hepatitis B viral replication affects recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Liver Int.* 28, 393–401.

de Kok J.B, Hendriks J.C, van Solinge W.W, Willems H.L, Mensink E.J, Swinkels D.W. (1998) Use of real-time quantitative PCR to compare DNA isolation methods. *Clin Chem*; 44:2201–4.

Laktionov, P.P., Tamkovich S.N., Rykova E.Yu., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Vlassov V.V. (2004). Cell-Surface-Bound Nucleic Acids: Free and Cell-Surface-Bound Nucleic Acids in Blood of Healthy Donors and Breast Cancer Patients. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1022.1: 221-27.

Leary, R. J., Kinde I., Diehl F., Schmidt K., Clouser C., Duncan C., Antipova A., Lee C., Mckernan K., De La Vega F. M., Kinzler K. W., Vogelstein B., Diaz L. A., Velculescu V. E. (2010). Development of Personalized Tumor Biomarkers Using Massively Parallel Sequencing. *Science Translational Medicine* 2.20: 20ra14.

Lengauer C. , Kinzler K. W., Vogelstein B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643–649.

Li J., Wang L., Mamon H., Kulke M.H., Berbeco R., Makrigiorgos G.M. (2008). Replacing PCR with COLD-PCR Enriches Variant DNA Sequences and Redefines the Sensitivity of Genetic Testing. *Nature Medicine* 14.5: 579-84.

Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F. Richmond T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.

Mancini, I., Santucci C., Sestini R., Simi L., Pratesi N., Cianchi F., Valanzano R., Pinzani P., Orlando C. (2010). The Use of COLD-PCR and High-Resolution Melting Analysis Improves the Limit of Detection of KRAS and BRAF Mutations in Colorectal Cancer. *The Journal of Molecular Diagnostics* 12.5: 705-11.

Murria R., Palanca S., de Juan I., Egoavil C., Alenda C., García-Casado Z., Juan M.J., Sánchez A.B., Santaballa A., Chirivella I., Segura Á., Hervás D., Llop M., Barragán E., Bolufer P. (2015). Methylation of tumor suppressor genes is related with copy number aberrations in breast cancer. *American journal of cancer research*, 5(1):375-85.

Nagata, S. (2005). DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 853–875.

Proskuryakov, S.Y., Gabai V.L. (2010). Mechanisms of Tumor Cell Necrosis. *Current Pharmaceutical Design* 16.1: 56-68.

Schwarzenbach, H., Hoon D.S.B., Pantel K. (2011). Cell-free Nucleic Acids as Biomarkers in Cancer Patients. *Nature Reviews Cancer* 11.6: 426-37.

Stollar B., Stephenson F. (2002). Apoptosis and Nucleosomes. *Lupus* 11.12: 787-89.

Stroun M., Lyautey J., Lederrey C., Olson-Sand A., Anker P. (2001). About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta*; 313(1–2):139–142.

Tamkovich S.N., Vlassov V.V., Laktionov P.P. (2008). Circulating deoxyribonucleicacids in blood and its using in medical diagnostics (vene keeles). *Mol Biol (Mosk)*; 42(1): 12–23.

Van Der Vaart, M., Pretorius P. J. (2008). Circulating DNA. Its Origin and Fluctuation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1137: 18-26.

Viorritto, I.C. *et al.* (2007). Autoimmunity versus tolerance: can dying cells tip the balance? Clin Immunol. 122:125–134

Ward, T. H. *et al.* (2008). Biomarkers of apoptosis. Br. J. Cancer 99, 841–846.

Wong I.H., Lo Y.M., Zhang J., Liew C.T., Ng M.H., Wong N., Lai P.B., Lau W.Y., Hjelm N.M., Johnson P.J. (1999). Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. Cancer Res. 59: 71-73.

Wong, T.-S. (2004). Quantitative Plasma Hypermethylated DNA Markers of Undifferentiated Nasopharyngeal Carcinoma." Clinical Cancer Research 10.7: 2401-406.

Xue, X., Teare M.D., Holen I., Zhu Y.M., Woll P.J. (2009). Optimizing the Yield and Utility of Circulating Cell-free DNA from Plasma and Serum. Clinica Chimica Acta 404.2: 100-04.

Yang, H. J., Liu V. W. S., Tsang P. C. K., Yip A. M. W., Tam K. F., Wong L. C., Ng T. Y., Ngan H. Y. S. (2004). Quantification of Human Papillomavirus DNA in the Plasma of Patients with Cervical Cancer. International Journal of Gynecological Cancer 14.5: 903-10.

Zaitsev, V.G., Skvorcov V.V. (2009). Perspektiivid DNA tuvastamiseks vereplasmast onkoloogiliste haiguste diagnosteerimiseks ja monitoorimiseks (vene keeles). ПМЖ (Русский Медицинский Журнал). Онкология 17(13): 864–866.

Zhang, X. K., Elbin C. S., Chuang W.-L., Cooper S. K., Marashio C. A., Beauregard C., Keutzer J. M. (2008). Multiplex Enzyme Assay Screening of Dried Blood Spots for Lysosomal Storage Disorders by Using Tandem Mass Spectrometry. Clinical Chemistry 54.10: 1725-728.

Zuo, Z., Chen S.S., Chandra P.K., Galbincea J.M., Soape M., Doan S., Barkoh B.A., Koeppen H., Medeiros L.J., Luthra R. (2009). Application of COLD-PCR for Improved Detection of KRAS Mutations in Clinical Samples. *Modern Pathology* 22.8: 1023-031.



## Kasutatud veebilehed

Cell Signaling Technology. Regulation of Apoptosis Signaling Pathway. Külastatud 2014. aastal, aadressil [http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Apoptosis\\_Overview.html](http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Apoptosis_Overview.html)

World Health Organisation. Global Health Observatory (GHO) data. Cancer mortality and morbidity. Külastatud 11. mail, 2015, aadressil [http://www.who.int/gho/ncd/mortality\\_morbidity/cancer/en/](http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/)

International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012 project. Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. Külastatud 11. mail, 2015, aadressil [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)

## **Tänuavaldused**

Soovin tänada oma juhendajat Tarmo Annilot suurepärase juhendamise eest. Suured tänud kõigile biotehnoloogia õppetooli inimestele, kes aitasid kaasa erinevates töö etappides. Samuti sooviks tänada oma peret ja lähedasi suure toetuse eest.

# **Lihtlitsents**

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Ustina Põnova (sünnikuupäev: 02.01.1993)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Tsirkuleeriva rakuvaba DNA kasutamine vähi biomarkerina“, mille juhendaja on Tarmo Annilo, PhD
  - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
  - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2015